

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

**Charakterisierung der Wechselwirkung
aliphatischer Bisguanylhydrazone
mit Ribonukleinsäure**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Walter Christian Weinbach
aus Westhofen

Mainz 1971

1972

Charakterisierung der Wechselwirkung
elektrolytischer Eigenschaften
mit Polymerisation

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Charakterisierung der Wechselwirkung
aliphatischer Bisguanylhydrazone
mit Ribonukleinsäure

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Walter Christian Weinbach

aus Westhofen

Mainz 1971

Dekan: Prof. Dr. A. Mayet
Referent: Prof. Dr. U. Wollert
Korreferent: Prof. Dr. G. Kuschinsky
Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1972



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	4
1. Untersuchte Substanzen	4
2. Vordialyse der Ribonukleinsäure	5
3. Bestimmung der Bestandteile und Charakterisierung der Auftragslösungen	7
4. Sephadexgelfiltration	8
5. Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert der Lösung	9
6. Temperaturabhängigkeit der Bindung	10
7. Einfluß von Natriumchlorid und Harnstoff auf die Wechselwirkungen von Bisguanylhydrazonen und Ribonukleinsäure	10
8. Charakterisierung der Wechselwirkung der Bisguanylhydrazone und Ribonukleinsäure	12
9. Statistische Methoden	13
III. Versuchsergebnisse	16
1. Charakterisierung der Wechselwirkungen der untersuchten aliphatischen Bisguanylhydrazone mit Ribonukleinsäure	16
2. Abhängigkeit der Wechselwirkungen der Bisguanylhydrazone mit Ribonukleinsäure von:	19
a) der Bisguanylhydrazon-Konzentration	19
b) der Ribonukleinsäure-Konzentration	34
c) dem pH-Wert	38
d) der Natriumchlorid-Konzentration	38
e) der Harnstoffkonzentration	42
f) der Temperatur	42
IV. Diskussion	44
V. Literaturverzeichnis	53
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Die herzoglykosidartige Wirkung verschiedener Bisguanylhydrazone ist aus Untersuchungen mehrerer Autorengruppen bekannt (Kroneberg u. Mitarb., 1964; Greeff u. Mitarb., 1964; Ehmer u. Mitarb., 1964).

Bisguanylhydrazone wirken im Tierversuch ähnlich wie Herzglykoside, sie steigern die Kontraktionsamplitude der Herzmuskulatur und führen in hoher Konzentration am Herzmuskel zur Kontraktur. Sie beeinflussen den Calcium- und Kalium-Stoffwechsel und das Membranverhalten der Herzmuskelzelle wie die Digitalissubstanzen. Diese für Herzglykoside charakteristischen Wirkungen besitzen die Bisguanylhydrazone jedoch bei Anwendung am Ganztier nur mit einer sehr kurzen Wirkungsdauer (Übersicht bei Wollert, 1969).

Die Anwendung der Substanzen beim Menschen zur chronischen Behandlung der Herzinsuffizienz erwies sich bisher als unbrauchbar, obwohl die meisten bisher untersuchten Bisguanylhydrazone in den verschiedenen Versuchsanordnungen jeweils eine größere therapeutische Breite als vergleichend untersuchte Herzglykoside hatten (Schneider u. Mitarb., 1965 u. 1966). Bisher ist noch kein BG beschrieben worden, dessen digitalisartige Wirkung über längere Zeit anhält.

Nicht ohne Bedeutung könnten die Ergebnisse der Organverteilungsuntersuchungen von einigen Bisguanylhydrazonen des 3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon (BG 60), des Dodecandion-2,11-bisguanylhydrazon (BG 32) und des Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon (BG 31) für die klinische Anwendung der BGs an Stelle der Digitalis-substanzen sein. Denn obwohl nach wenigen Stunden nach der Infusion kein BG 31, BG 32 und BG 60 im Blut mehr nachweisbar war, lag dagegen im Herzen bei BG 31 nach 7 Tagen und bei BG 60 sogar noch nach 4 Monaten fast unverändert die gleiche Konzentration vor wie unmittelbar nach Infusionsende. In allen anderen untersuchten Organen ließ sich dagegen zu diesem Zeitpunkt nur noch wenig oder keine Substanz mehr nachweisen. BG 32 verhält sich in den Verteilungsuntersuchungen unmittelbar nach Infusion in den verschiedenen Organen ähnlich dem BG 31 und BG 60, dagegen liegt es schon 12 Stunden nach Infusionsende in deutlich verringerten Konzentrationen vor und ist nach 7 Tagen fast völlig aus dem Organismus verschwunden (Hofmann u. Wollert, 1969 a+b).

Die Halbwertszeit für das Verschwinden der Substanz BG 60 beträgt ungefähr ein Jahr. Innerhalb der Herzmuskelzelle wird das BG 60 spezifisch in der Mikrosomenfraktion angereichert (Hofmann u. Wollert, 1969 c), wie es Dutta u. Mitarb. (1967) und Gerber u. Mitarb. (1968) auch für Herzglykoside nachweisen konnten. Auf Grund des hohen

Gehaltes der Mikrosomenfraktion an Ribonukleinsäure (50 % RNS-Anteil)¹ (Siebert, 1967) besteht die Möglichkeit, daß diese Substanz unspezifisch mit der RNS in Wechselwirkung tritt oder an sie gebunden wird. Riechert und Wollert (1971) konnten in ihren Untersuchungen mit Hilfe der Sephadex-Gel-Filtration (Krieglstein u. Kuschinsky, 1968; Hofmann u. Mitarb., 1970), die sich auch für die Untersuchung der Wechselwirkung von RNS und niedermolekularen Substanzen als brauchbar erwies, zeigen, daß BG 60 und BG 31 sehr stark an Ribonukleinsäure gebunden sind. Hofmann und Mitarb. (1970) untersuchten die Bindungen einiger aromatischer und aliphatischer Guanylhyazone an Humanalbumin, um Aufschluß über die Bindungsart zu erhalten. Dabei wurde die Eiweißbindung der Guanylhyazone hauptsächlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt. Riechert und Wollert (1971) diskutierten auf Grund der Ergebnisse bei der RNS-Bindung des BG 60 und des BG 31 eine Ionenbindung, da der Zusatz von Natriumchlorid zur BG-RNS-Lösung eine Abnahme der RNS-Bindung bewirkt. Um weiteren Aufschluß über die Wechselwirkung zwischen Guanylhyaazonen und Ribonukleinsäure zu erhalten, untersuchten wir die RNS-Bindung einer homologen Reihe der aliphatischen Bisguanylhyazone.

¹ Folgende Abkürzungen werden verwendet:

RNS = Ribonukleinsäure; BG = Bisguanylhyaazon

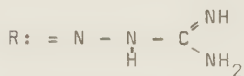
II. METHODIK

Die Wechselwirkungen zwischen folgenden aliphatischen Bisguanylhydrazonen und Hefe-RNS (Nr. 15332 Firma Boehringer, Mannheim) wurden untersucht:

Tab. 1

Chemische Bezeichnungen, Strukturformeln und Abkürzungen der verwendeten aliphatischen Bisguanylhydrazone.

Pentandion-2,4-bisguanylhydrazon- dinitrat		$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} \qquad \qquad \text{R} \end{array} \cdot 2 \text{HNO}_3$	BG2
Hexandion-2,5-	"	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} \qquad \qquad \qquad \text{R} \end{array}$	BG4
Nonandion-2,8-	"	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} \qquad \qquad \qquad \text{R} \end{array}$	BG7
Undekandion-2,11-	"	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_7-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} \qquad \qquad \qquad \text{R} \end{array}$	BG17
Dodekandion-2,11-	"	$\begin{array}{c} \text{H}_3-\text{C}-(\text{CH}_2)_8-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \parallel \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{R} \qquad \qquad \qquad \text{R} \end{array}$	BG32



2. Vordialyse der Ribonukleinsäure

Für die Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den aliphatischen Bisguanylhydrazonen und Hefe-RNS konnte nur vordialysierte Ribonukleinsäure verwendet werden. Die Elutionskurve einer nicht vordialysierten 1g%igen RNS-Lösung zeigt Abbildung 1. Die Elutionskurve besteht aus einem Hauptgipfel (RNS) und zwei kleinen Gipfel, die wahrscheinlich niedermolekulare Bruchstücke darstellen.

Zur Vordialyse der Hefe-RNS wurden 1,8 g RNS in 100 ml 0,2 M Trispufferlösung pH 7,40 gelöst. Die 1,8%ige Ribonukleinsäurelösung wurde zur Entfernung der kleinemolekularen Anteile 4 Tage bei $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ gegenüber Trispufferlösung pH 7,40 dialysiert, wobei täglich der Puffer gewechselt wurde und die 100 ml 1,8%ige RNS-Lösung insgesamt gegen 8 l Pufferlösung dialysiert wurden. Zur Vordialyse wurden Visking-Dialysierschläuche (Fa. Serva Nr. 44110 Heidelberg) mit einem mittleren Porenradius von 24 Ångström verwendet, wodurch die freie Diffusion von Ionen und niedermolekularen Verbindungen, RNS-Bruchstücken und Oligonukleotiden gegeben war, während die hochmolekulare Ribonukleinsäure und RNS-Aggregate nicht durchgelassen wurden.

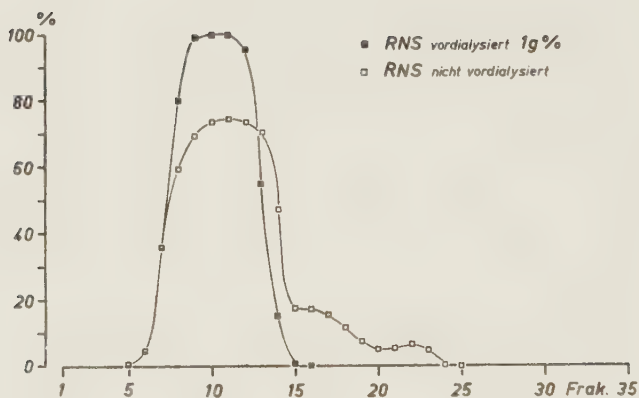


Abb. 1

Elutionskurven einer 1g%igen nicht vordialysierten und einer 1g%igen vordialysierten Hefe-Ribonukleinsäurelösung an einer Sephadex-G-25-Säule (40 cm Länge, 1,2 cm Durchmesser und 20 ml Auftragsvolumen, Temperatur 22°C). Auf der Abszisse ist die Zahl der Fraktionen und auf der Ordinate der Anteil der Substanz in % von der Ausgangskonzentration aufgetragen.

3. Bestimmung der Bestandteile und Charakterisierung der Auftragslösungen

Nach der Vordialyse wurde die Konzentration der RNS nach der Methode von I-San Lin und Schjeide (1969) bestimmt. Durch Verdünnung mit 0,2 M Trispufferlösung pH 7,40 wurde eine 1 g, 0,5 g und 0,1 g % ige RNS-Lösung hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde potentiometrisch kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 N Salzsäure (HCL) oder 1 N Natronlauge (NaOH) korrigiert. Das Elutionsdiagramm einer 1%igen vordialysierten RNS-Lösung ist ebenfalls in Abb. 1 dargestellt. Die aliphatischen Bisquanylhydrazone wurden mit der Indikator-Komplexmethode von Hofmann und Wollert (1969 d) nachgewiesen.

RNS-Substanzlösungen:

Die Wechselwirkungen der Substanzen wurden in folgendem Konzentrationsbereich in 1 g % igen bzw. bei BG 32 auch

BG 2	$0,445 \cdot 10^{-4} - 3,55 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
BG 4	$0,426 \cdot 10^{-4} - 3,41 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
BG 7	$0,378 \cdot 10^{-4} - 3,03 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
BG 17	$0,356 \cdot 10^{-4} - 2,84 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
BG 32	$0,344 \cdot 10^{-4} - 2,74 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

in 0,5 g % und 0,1 g % igen vordialysierten RNS-Lösungen untersucht.

4. Sephadexgelfiltration

Die quantitative Bestimmung der Ribonukleinsäurebindung der aliphatischen Bisquanylhydrazone erfolgte mit Hilfe der Sephadexgelfiltration, die sich zur Charakterisierung der Eiweißbindung von organischen und anorganischen Stoffen neben den Methoden der Dialyse und Ultrazentrifuge als brauchbar erwiesen hat (Kriegelstein u. Kuschinsky, 1968). Auch zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Bisquanylhydrazonen und RNS kann diese Methode verwendet werden (Riechert u. Wollert, 1971).

Der Ribonukleinsäurelösung (1 g, 0,5 g und 0,1 g %) wurden entsprechende Mengen der aliphatischen Bisquanylhydrazone aus einer Stammlösung von 10^{-3} g/ml zugegeben und 20 ml einer RNS-BG-Lösung pH 7,40 hergestellt. Diese Versuchslösung wurde auf eine 40 cm lange (Durchmesser 1,2 cm) Sephadex-G-25 Säule aufgetragen und bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 18 ml pro Stunde eluiert. Die Gelfiltrationen wurden bei Zimmertemperatur (20°C) durchgeführt, ausgenommen der Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit. Wenn die Oberfläche der Sephadexsäule nicht mehr mit der RNS-BG-Lösung bedeckt war, wurde zur weiteren Elution Trispufferlösung pH 7,40 in ausreichender Menge aufgetragen. Das Eluat wurde vom Zeitpunkt des Auftragens der RNS-BG-Lösung an in Fraktionen von je 3 ml, pro Stunde etwa 6 Fraktionen, aufgefangen und bis Fraktion 45

gesammelt. In den einzelnen Fraktionen wurde der RNS-Gehalt und die BG-Konzentration bestimmt. Die RNS-Konzentration wurde nach der Methode von I-San Lin und Schjeide (1969) bestimmt. Die aliphatischen Bisguanylhidrazone wurden mit der Indikator-Komplexmethode von Hofmann und Wollert (1969 d) nachgewiesen. Ein Beispiel eines Gelfiltrationsversuches einer 1 g %igen RNS- und 3 mg %igen BG 32-Lösung ist in Abbildung 2 dargestellt. Innerhalb des ersten Plateaus entsprechend den Elutionsvolumina von 18 ml bis 32 ml in Abb. 2 erreicht die RNS- und die BG-Konzentration 100 % der Ausgangskonzentration. Die BG-Konzentration fällt gering verzögert mit der RNS-Konzentration ab und in der RNS-freien Zone stellt sich erneut ein Plateau ein, das den freien, nicht gebundenen Anteil der Substanz darstellt. In den darauffolgenden Fraktionen fällt die Konzentration der niedermolekularen Substanz auf Null ab.

5. Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert der Lösung

Für die Versuche zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen dem aliphatischen Bisguanylhidrazon BG 32 und Ribonukleinsäure wurde die Hefe-RNS mit 0,2 M Trispuffer pH 7,20, 7,40, 7,60, 7,80 und 8,00 vordialysiert. Die Auftragslösung und die Lösung für die

Vor- und Nachelution der Sephadex-G-25-Säule wurde mit dem entsprechenden pH-Wert hergestellt.

6. Temperaturabhängigkeit der Bindung

Die Wechselwirkungen der aliphatischen Substanz BG 32 mit RNS in Abhängigkeit von der Temperatur wurde bestimmt. Dabei wurden Versuche bei Temperaturen von 4⁰, 22⁰, 37⁰ und 50⁰C durchgeführt.

7. Einfluß von Natriumchlorid und Harnstoff auf die Wechselwirkungen von BG und RNS

Weiterhin wurde in einer Versuchsreihe der RNS-BG 32-Lösung Natriumchlorid in verschiedenen molaren Konzentrationen zugesetzt und die Abhängigkeit der Bindung von BG 32 an RNS von der NaCl-Konzentration bestimmt. Dabei wurde die NaCl-Konzentration von 0,01 M bis 0,15 M variiert. Zusätzlich wurde die Bindung aller anderen oben genannten Bisquanylhydrazone (3 mg %) unter dem Einfluß von 0,15 M NaCl untersucht. In einigen Versuchen wurde der RNS-BG-Lösung auch Harnstoff in 3 und 6 molarer Konzentration zugesetzt und die Wechselwirkung der Substanzen untersucht.

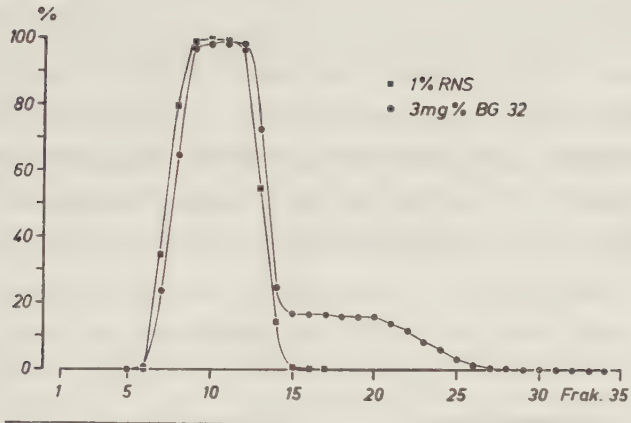


Abb. 2

Gelfiltration einer 1 g %igen Ribonukleinsäurelösung und 3 mg %igen BG 32-Lösung. Säulenlänge 40 cm, Durchmesser 1,2 cm, Auftragsvolumen 20 ml. Auf der Abszisse ist die Zahl der Fraktionen angegeben (Fraktionsvolumen 3 ml) und auf der Ordinate der Anteil der Substanzen in % der Ausgangskonzentrationen.

8. Charakterisierung der Wechselwirkung BG-RNS

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung der Substanzen mit RNS wurde der freie bzw. gebundene Anteil der Substanz ermittelt. Der prozentuale Anteil an freier Substanz α und der prozentuale Anteil an gebundener Substanz β ergeben sich direkt aus dem zweiten Plateau der Elutionskurve. Eine sehr häufige Charakterisierung der Ergebnisse von Bindungsversuchen ist die Darstellung nach Scatchard (1949), die neben der Gesamtbindungskonstanten K_1 auch eine Aussage über die Anzahl der möglichen Bindungsstellen n des RNS-Moleküls ermöglicht. Die Gesamtbindungskonstante K_1 ist erforderlich für die Berechnung der freien Reaktionsenergie ΔF^0 nach der Formel

$$\Delta F^0 = -R \cdot T \ln K_1$$

ΔF^0 = freie Reaktionsenergie [cal/M]
 R = universelle Gaskonstante [cal/grad . M]
 T = absolute Temperatur [°K]

Eine der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K ergibt sich nach der Darstellung nach Scholtan (1964), in der die Gesamtkonzentration c_g in 10^{-4} M auf der Abszisse zu dem Quotienten c_g/c_f auf der Ordinate als Funktion betrachtet werden. Der Wert K ergibt sich dabei als Schnittpunkt der Kurve mit der Ordinate. Um die Gesamtbindungskonstante K_1 zu erhalten, dividiert man den Wert K durch die molare Konzentration an Ribonukleinsäure. Da das Molekulargewicht der verwendeten Hefe-RNS nicht genau

bekannt ist, können wir die Gesamtbindungskonstante K_1 , die freie Reaktionsenergie ΔF^0 und die Anzahl der Bindungsstellen n nur nach willkürlicher Festlegung des Molekulargewichtes auf 100000 bzw. 500000 angeben.

Während sich in der Darstellung nach Scatchard (1949) gekrümmte Linien ergeben, lassen sich die Bindungsversuche nach Scholtan (1962) im doppelt-logarithmischen System durch gerade Linien wiedergeben, die der Gleichung

$$\log c_g = \log k^+ + m \log c_f \qquad k^+ = c_g / c_f^m$$

gehören. Dabei charakterisiert die apparente Bindungskonstante k^+ die Bindungsfähigkeit der Substanz in dem jeweils untersuchten Konzentrationsbereich. Die Steigungskonstante m der Bindungsgeraden gibt an, in welchem Maß sich die aufeinanderfolgenden Einzelbindungskonstanten unterscheiden. Wenn m kleiner als eins ist, so nehmen die aufeinanderfolgenden Bindungskonstanten ab. Dagegen nehmen sie zu, wenn m größer als 1,00 ist. Ist $m = 1,00$ sind alle Bindungskonstanten gleich.

9. Statistische Methoden

Zur Beschreibung der erhaltenen Ergebnisse wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen nach folgenden Formeln berechnet:

$$(1) \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$(2) \quad s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2}{n - 1}$$

$$(3) \quad s = \sqrt{s^2}$$

$$(4) \quad s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Die Wechselwirkungen zwischen der Ribonukleinsäure und den aliphatischen Bisguanylhydrazonen wurden durch Korrelations- und Regressionsrechnungen beschrieben. Die Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freier Substanz von der Bisguanylhydrazongesamtkonzentration c_g , die Abhängigkeit der Konzentration c_g an gebundener Substanz von der Konzentration c_f an freiem Bisguanylhydrazon (Scholtan, 1962) und die Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freiem BG 32 von der Natriumchloridkonzentration wurde durch Regressionsgeraden und durch Korrelationskoeffizienten charakterisiert.

Weiterhin wurden die α -Werte (freier Anteil der Substanz) für die Gesamtkonzentration von 3 mg % bei den Bisguanylhydrazonen varianzanalytisch untersucht und

der Scheffé-Test durchgeführt. Die varianzanalytische Untersuchung sollte nachweisen, zwischen welchen α -Werten signifikante Unterschiede bestehen und wie weit sich die Substanzen in den Wechselwirkungen mit der Ribonukleinsäure unterscheiden.

III. VERSUCHSERGEBNISSE

1. Charakterisierung der Wechselwirkungen der untersuchten aliphatischen Bisquanylhydrazone mit Ribonukleinsäure

Zu Beginn wurden getrennte Elutionsversuche mit 1 g %iger vordialysierter RNS und 0,344 M BG 32-Lösung bei einer Säulenlänge von 40 cm und 1,2 cm Durchmesser durchgeführt (Abb. 1 u. 3).

Bilanzuntersuchungen bei der 1 g, 0,5 g und 0,1 g %igen RNS- und 0,344 M BG 32-Lösung zeigten, daß das aliphatische Bisquanylhydrazon aus dem verwendeten Sephadex-G-25 nach einer bestimmten Elutionsdauer (bei Fraktion 45) völlig eluiert war, also nicht irreversibel adsorbiert wurde. Die Elutionskurve, die mit einer 1 g %iger RNS- und 0,344 M BG 32-Lösung erhalten wurde, zeigt Abb. 2. Auf der Abszisse ist das eluierte Flüssigkeitsvolumen aufgetragen, wobei die ersten Fraktionen links und die letzten rechts erscheinen und auf der Ordinate die Konzentration in % der Ausgangskonzentration. Die RNS-Elutionskurve wie auch die BG-Elutionskurve steigt nach der 6. Fraktion an, bis 100 % der Ausgangskonzentration erreicht sind. Nach der 12. Fraktion fallen beide Kurven ab, wobei die RNS-Konzentration in der 15. Fraktion annähernd den Wert 0 g % der Ausgangskonzentration

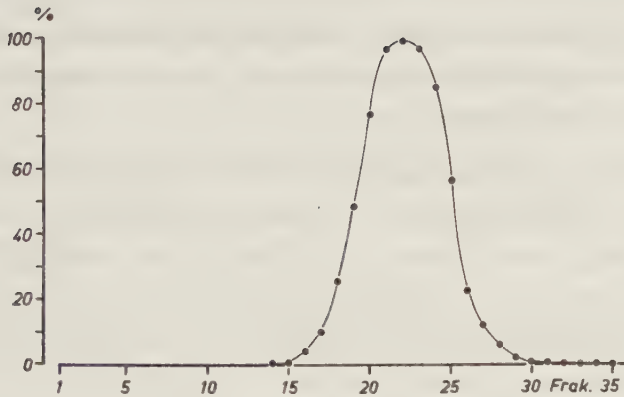


Abb. 3

Elutionskurve einer 3 mg %igen BG 32-Lösung.

Sephadex-G-25-Säule (40 cm Länge, 1,2 cm Durchmesser,
20 ml Auftragsvolumen, Temperatur 22°C)

Abszisse: Anzahl der Fraktionen (Fraktionsvolumen 3 ml)

Ordinate: % der Ausgangskonzentration von BG 32

erreicht, während die Elutionskurve von BG ein zweites Plateau ausbildet und schließlich auch auf den Wert 0 % der Ausgangskonzentration abfällt. Das zweite Plateau ist ein Maß für den freien, nicht gebundenen Anteil der Bisguanylhydrazone (α %).

Die RNS-Lösung mit der niedermolekularen Substanz wandert nach Auftrag durch die Säule, wobei nur der freie, nicht gebundene Anteil der Substanz in das Hohlraumsystem der Gelkörner hineingelangt und dadurch in seiner Wanderungsgeschwindigkeit verzögert wird, während die RNS und die RNS gebundene Substanz in Folge des größeren Molekulargewichtes nicht in die Zwischenräume eindringen können, außen entlangwandern und deshalb früher im Eluat erscheinen. Im ersten Teil der durchwandernden Probe wird das mit Trispuffer gesättigte und vordialysierte Sephadex mit nur geringen Adsorptionskräften ein Teil der Substanz aus der RNS-Bindung freigesetzt und dadurch kurzzeitig das Gleichgewicht gestört, deshalb muß die aufgetragene Lösungsmenge groß genug sein, daß nach dieser Gleichgewichtstörung eine Zone folgt, in der alle drei Reaktionspartner RNS, BG und RNS-BG-Komplex miteinander im ungestörten Gleichgewicht stehen, was durch die Ausbildung eines ersten Plateaus erfüllt ist (Nichol u. Winzor, 1964). Diese Feststellungen werden aus Abbildung 2 verständlich. Außerdem muß nach der Theorie von Gilbert

und Jenkins (1959) der RNS-BG-Komplex und die RNS die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben, was durch den geringen Molekulargewichtsunterschied zwischen RNS und dem RNS-BG-Komplex und durch das gleichzeitige Abfallen der Elutionskurven (Abb. 2) als gesichert gelten kann. Die nicht an RNS gebundene Substanz erscheint nach dem ersten Plateau und entspricht dem freien Anteil der Substanz.

2. Abhängigkeit der Wechselwirkungen der Bisquanylhydrazone mit Ribonukleinsäure

2.a) Die Abhängigkeit des α -Wertes von der Bisquanylhydrazongesamtkonzentration c_g .

Die Wechselwirkung der untersuchten Substanzen mit Ribonukleinsäure ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich nur wenig von der BG-Gesamtkonzentration c_g abhängig. Die Bindung der aliphatischen Bisquanylhydrazone an Ribonukleinsäure nimmt mit zunehmender Kettenlänge der Substanzen ab. Das Pentandion-2,4-bisquanylhydrazondinitrat (BG 2) hat gegenüber dem Dodekandion-2,11-bisquanylhydrazondinitrat (BG 32) einen kleineren α -Wert. Auch BG 4 und BG 7 haben einen geringeren α -Wert als BG 32. Annähernd den gleichen α -Wert haben BG 17 und BG 32. Die Abhängigkeit des α -Wertes von der Gesamtkonzentration $c_g \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ist in Abbildung 4 dargestellt.

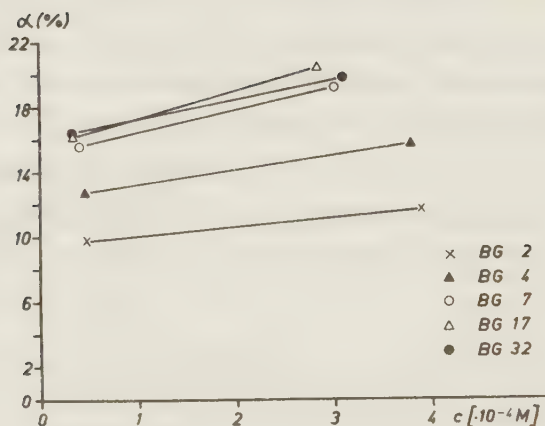


Abb. 4

Bindungsvermögen einer 1 g %igen Ribonukleinsäurelösung für aliphatische Bisguanyldiazotization. Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freiem Bisguanyldiazotization auf der Ordinate in % der Ausgangskonzentration von der Bisguanylgesamtkonzentration c (in 10^{-4} M) auf der Abszisse.

Dargestellt sind die Regressionsgeraden.

Die Punkte an den Regressionsgeraden begrenzen den untersuchten Konzentrationsbereich.

n = Anzahl der Versuche; r = Korrelationskoeffizient

BG 2 $y = 0,561x + 9,53$ $r = 0,91$ $n = 44$

BG 4 $y = 0,62x + 11,93$ $r = 0,95$ $n = 46$

BG 7 $y = 0,64x + 15,2$ $r = 0,95$ $n = 38$

BG 17 $y = 0,68x + 15,6$ $r = 0,97$ $n = 24$

BG 32 $y = 0,60x + 16,0$ $r = 0,90$ $n = 70$

Tabelle 2 enthält die Werte von c_g (10^{-4} M) und die α -Werte der untersuchten Substanzen bei der Konzentration von 3 mg %.

Tab. 2

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Bisguanylhydrazonen von der Bisguanylhydrazongesamtkonzentration c_g (10^{-4} M). 1 g %ige Ribonukleinsäurelösung, pH-Wert 7,40, Sephadex-G-25-Säule von 40 cm Länge und 1,2 cm Durchmesser, Temperatur 20°C.

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ dar.

c_g (10^{-4} M)	α (%)	n = Anzahl der Versuche
BG 2 0,886	10,22 $\pm$ 0,09	12
BG 4 0,851	12,89 $\pm$ 0,10	16
BG 7 0,756	16,44 $\pm$ 0,18	9
BG 17 0,712	17,00 $\pm$ 0,15	4
BG 32 0,687	17,25 $\pm$ 0,12	24

Gesamtkonzentration c_g , Gesamtbindungskonstante K_1 , Anzahl der Bindungsstellen n und die freie Reaktionsenergie ΔF^0 :

Die Darstellung der Versuchsergebnisse nach Scatchard (1949) Abbildung 5 und 6 ergibt für BG 32, BG 17 und BG 7 fast gerade und für BG 4 und BG 2 leicht gekrümmte Linien. In dieser Darstellung ergibt sich die Gesamtbindungskonstante K_1 als Schnittpunkt der einzelnen Linien mit der Ordinate, die die Bezeichnung trägt $\bar{r}/c_f$ ($l/M \cdot 10^4$). Verlängert man die Kurven nach rechts, so schneiden sie die Abszisse. Dieser Schnittpunkt gibt die Anzahl der Bindungsstellen n pro Ribonukleinsäuremolekül an. Während sich die weniger stark an die RNS gebundenen aliphatischen BGs mit der größeren Zahl von CH_2 -Gruppen steiler zu Abszisse verhalten, läuft die Kurve der am stärksten an Ribonukleinsäure gebundene Substanz BG 2 fast parallel zur Abszisse. Die Anzahl der Bindungsstellen n , die graphisch nach der Darstellung nach Scatchard (1949) als Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse ermittelt werden kann, ist sicher größer als 14. Da das Molekulargewicht der verwendeten Hefe-RNS nicht bekannt ist, können wir die Gesamtbindungskonstante K_1 , die freie Reaktionsenergie ΔF^0 und die Anzahl der Bindungsstellen n nur nach willkürlicher Festlegung des Molekulargewichtes der Ribonukleinsäure auf 100000 (Abb. 6) und 500000 (Abb. 5) errechnen (Riechert u. Wollert, 1971).

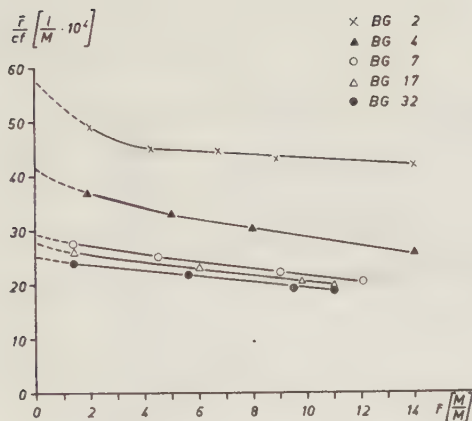


Abb. 5

Abhängigkeit des Quotienten $\bar{r}/c_f$ (10^4 l/M) auf der Ordinate vom spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$ (M/M) auf der Abszisse nach der Darstellung nach Scatchard (1949). Bindungsvermögen einer 1 g % Ribonukleinsäurelösung für die untersuchten aliphatischen Bisguanyldiazone.

Angenommenes Ribonukleinsäuremolekulargewicht = 500000 (vgl. Tab. 4). Die Punkte in der Darstellung stellen arithmetische Mittelwerte dar. $n \geq 20$

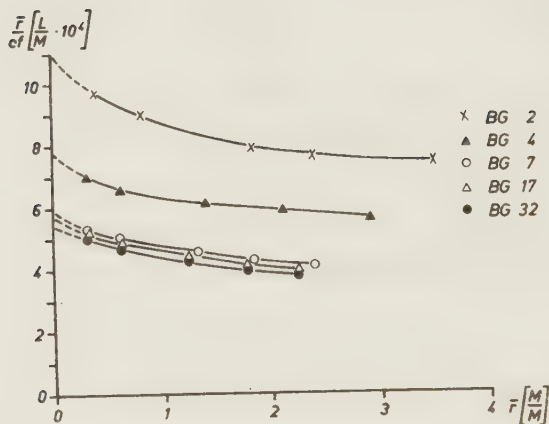


Abb. 6

Abhängigkeit des Quotienten $\bar{r}/c_p$ (10^4 l/m) auf der Ordinate vom spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$ (m/m) auf der Abszisse nach der Darstellung von Scatchard (1949). Bindungsvermögen einer 1 g % Ribonukleinsäurelösung für die untersuchten aliphatischen Bisguanilhydrazone.

Angenommenes Ribonukleinsäuremolekulargewicht = 100000 (vgl. Tab. 4). Die Punkte in der Darstellung stellen arithmetische Mittelwerte dar. $n \geq 20$

In der Tabelle 3 sind die Werte der Gesamtbindungskonstanten K_1 und die Werte der freien Reaktionsenergie ΔF^0 zusammengestellt.

Die Darstellung der Versuchsergebnisse nach Abbildung 7 ermöglicht auch die Ermittlung der Anzahl der Bindungsstellen n . Dabei ist die Ordinate mit dem reziproken Wert von $\bar{r}$ und die Abszisse mit dem reziproken Wert von c_f bezeichnet. Der Schnittpunkt der Geraden ergibt sich als $1/n$, damit ist auch mit dieser Darstellung eine Ermittlung der Anzahl der möglichen Bindungsstellen wie nach der Darstellung nach Scatchard gegeben.

Die Abbildung 8 zeigt, daß die Ribonukleinsäurebindung der aliphatischen BGs in dem untersuchten Bereich noch lange nicht erschöpft ist. Die Kurven in der Darstellung zeigen, daß sich das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ für jede einzelne Substanz einem maximalen Wert nähert. Die RNS-Bindungskapazität der aliphatischen BGs ist nach dem Verlauf der Kurven erreichbar, wobei die längerkettigen Bisquanylhydrazone den Sättigungszustand früher erreichen als die kurzkettigen BGs.

Eine der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe erhält man nach Abbildung 9, in der c_g/c_f als Ordinate gegen c_g als Abszisse dargestellt ist. Dabei kann man aus der Größe K , die sich als Schnittpunkt der Kurven mit der Ordinate ergibt, durch Division der molaren

Tab. 3

Charakterisierung der Wechselwirkung der untersuchten aliphatischen Bisguanilylhydrazone mit 1 g %iger Ribonukleinsäurelösung durch: K Proportionale Größe der Gesamtbindungskonstanten K_1 (Abb. 9, Darstellung nach Scholtan, 1964), die Gesamtbindungskonstante K_1 (nach Scatchard, 1949, Abb. 5 und Abb. 6) und die freie Reaktionsenergie Δf^0 . 1 und 2 : angenommenes RNS-Molekulargewicht 50000 und 100000.

aliphatische Bisguanilyl- hydrazone	K (Abb. 9)	K_1 nach Scatchard (Abb. 5 u. Abb. 6)	K_1 nach K/RNS-Konzentration	$\Delta f^0 = -RT \ln K_1$
BG 2	10,2	59 ¹	11 ²	51 ¹ 10,2 ² 7729 ¹ 6750 ²
BG 4	7,5	41 ¹	7,8 ²	38 ¹ 7,5 ² 7520 ¹ 6450 ²
BG 7	5,8	29 ¹	5,9 ²	29 ¹ 5,8 ² 7500 ¹ 6390 ²
BG 17	5,7	28 ¹	5,7 ²	28 ¹ 5,7 ² 7490 ¹ 6350 ²
BG 32	5,4	25 ¹	5,5 ²	27 ¹ 5,4 ² 7250 ¹ 6300 ²

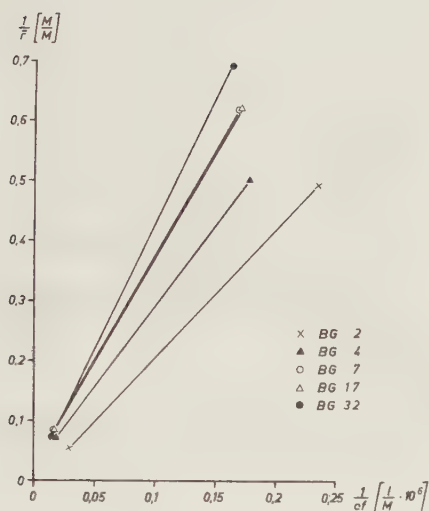


Abb. 7

Bindungsvermögen einer 1 g %igen Ribonukleinsäurelösung für BG 2, BG 4, BG 7, BG 17 und BG 32. Abhängigkeit des reziproken spezifischen Bindungsvermögens $1/\bar{r}$ (m/m) von der reziproken freien Bisguanyldiazonkonzentration $1/c_f$ (10^6 l/m).

Ordinate: $1/\bar{r}$ (m/m); Abszisse $1/c_f$ (10^6 l/m)

Dargestellt sind die Regressionsgeraden.

BG 32 $y = 4,60x + 0,020$ $r = 0,89$ $n = 76$

BG 17 $y = 3,63x + 0,024$ $r = 0,99$ $n = 26$

BG 7 $y = 3,81x + 0,026$ $r = 0,99$ $n = 38$

BG 4 $y = 2,77x + 0,035$ $r = 1,00$ $n = 47$

BG 2 $y = 2,28x - 0,0001$ $r = 0,87$ $n = 44$

n = Anzahl der Versuche; r = Korrelationskoeffizient

Angenommenes RNS-Molekulargewicht 50000

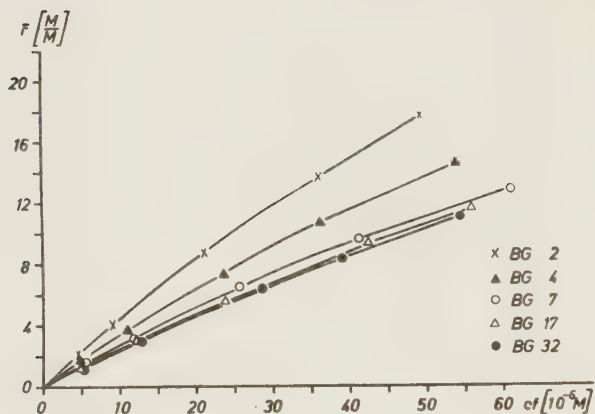


Abb. 8

Bindungsvermögen einer 1 g %igen RNS-Lösung für die untersuchten aliphatischen BGs. Abhängigkeit des spezifischen Bindungsvermögens $\bar{r}$ von der freien Bis-guanyldiazonkonzentration c_f .

Ordinate: $\bar{r}$ (M/M); Abszisse: c_f (10^{-6} M)

Angenommenes RNS-Molekulargewicht 500000

Die Punkte stellen arithmetische Mittelwerte dar.

$n \geq 20$

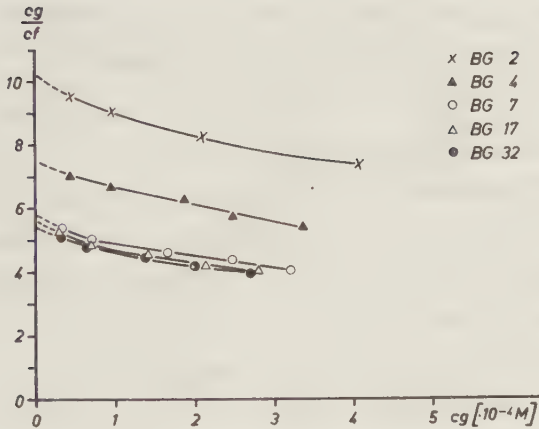


Abb. 9

Bindungsvermögen einer 1 g %igen RNS-Lösung für aliphatische Bisquanylhyazone. Abhängigkeit des Quotienten c_g/c_f (auf der Ordinate) von der Konzentration c_g ($10^{-4} M$, auf der Abszisse) an gebundenem Bisquanylhyaizon. Darstellung nach Scholtan (1964) zur Ermittlung der zur Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K . Die Punkte stellen arithmetische Mittelwerte dar. $n \geq 20$

Konzentration von Ribonukleinsäure die Gesamtbindungskonstante K_1 wie in der Darstellung nach Scatchard erhalten. Die Werte sind in Tabelle 4 angegeben.

Aus der Gleichgewichtskonstanten K_1 berechnet sich die freie Reaktionsenergie nach der Formel $\Delta F^0 = -RT \ln K_1$. Bei den errechneten Werten sind die angenommenen Molekulargewichte von 100000 und 500000 verwendet worden. Der Vergleich der nach den beiden verschiedenen Methoden (Scatchard, 1949 und Scholtan, 1964) erhaltenen Werten der Gesamtbindungskonstanten K_1 zeigt bei den einzelnen Werten nur ganz geringe Abweichungen (vgl. Tab. 3).

Nach der Darstellung nach Scholtan (1962) in Abbildung 10 lassen sich die Ergebnisse der Bindungsversuche im doppeltlogarithmischen System als gerade Linien wiedergeben, die der Gleichung

$$\log c_g = \log k^+ + m \log c_f \quad k^+ = c_g/c_f^m$$

gehören. Für die untersuchten aliphatischen Bisquanylhydrazone ist m stets kleiner als 1 (Tab. 4), d.h., daß die Bindungsstellen abnehmen (Scholtan, 1962) und die einzelnen bindenden Gruppen des RNS-Moleküls unterschiedliche Affinität besitzen. Die Formel 1 zeigt, daß zwischen dem Logarithmus der Konzentration an gebundener Substanz ($\log c_g$) und dem Logarithmus der Konzentration an freier Substanz ($\log c_f$) ein linearer Zusammenhang besteht. Die Beziehung zwischen c_g und c_f ist für die einzelnen

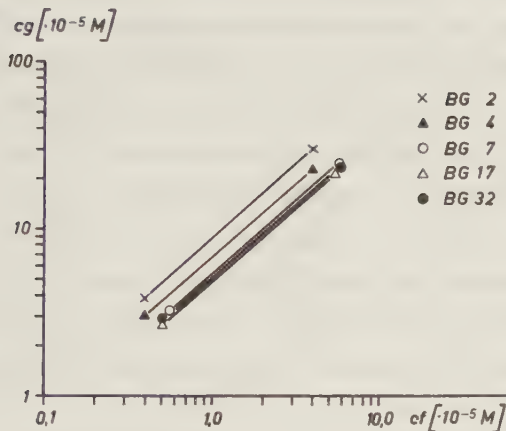


Abb. 10

Bindungsvermögen einer 1 g %igen RNS-Lösung für die untersuchten aliphatischen Bisguanyldiazotized. Abhängigkeit der Konzentration c_g an gebundenem Bisguanyldiazotized ($c_g \cdot 10^{-5}$ M, auf der Ordinate) von der Konzentration c_f ($c_f \cdot 10^{-5}$ M, auf der Abszisse) an freiem Bisguanyldiazotized bei einer 1 g %igen RNS-Konzentration. Die Punkte in der Darstellung begrenzen die auf den im doppeltlogarithmischen System gezeichneten und berechneten Regressionsgeraden.

Darstellung nach Scholtan (1962).

BG 2 $y = 0,9012x + 1,3407$ $r = 0,9992$ $n = 41$

BG 4 $y = 0,8770x + 1,3208$ $r = 0,9987$ $n = 43$

BG 7 $y = 0,8923x + 1,1477$ $r = 0,9988$ $n = 36$

BG 17 $y = 0,8861x + 1,1581$ $r = 0,9997$ $n = 24$

BG 32 $y = 0,9055x + 1,0697$ $r = 0,9988$ $n = 73$

n = Anzahl der Versuche; r = Korrelationskoeffizient

Die Einzelwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

aliphatischen Bisguanylhydrazone durch Regressionsgeraden in Abb. 10 im doppeltlogarithmischen System (Darstellung nach Scholtan, 1962) dargestellt. Die Steigungskonstanten b , die den berechneten Regressionskoeffizienten entsprechen, sind in Tab. 4 zusammengestellt. Die Korrelationskoeffizienten, als Ausdruck dafür, wie eng die Abhängigkeit der beiden Variablen (c_g und c_f) ist, haben Werte um 0,9900, d.h. die Abhängigkeit zwischen den beiden Variablen ist vollständig. Die Geraden in Abbildung 10 sind signifikant untereinander verschieden. Die apparente Bindungskonstante k^+ ergibt sich in der Darstellung nach Scholtan als Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate bei $c_f = 1$. Ein Maß für die Steigung der Geraden ist die Konstante m . Sie ist ein Maß dafür, wie stark sich die Einzelbindungskonstanten des Ribonukleinsäuremoleküls voneinander unterscheiden. Die Werte der Steigungskonstanten m und der apparenten Bindungskonstanten k^+ sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Größe k^+ ist von der Bindungskonstanten der Reaktion abhängig und ein Maß für die Bindungsaffinität des Ribonukleinsäuremoleküls für das Bisguanylhydrazon und zwar gibt sie an, wieviel mal so groß im Gleichgewichtszustand die Konzentration an gebundenem BG im Vergleich zur Konzentration an freiem BG ist, bestimmt bei $c_f = 1$.

Es stellt sich die Frage, ob die in Tabelle 2 dargestellten Mittelwerte der α -Werte der untersuchten

Tab. 4

Charakterisierung der Wechselwirkung der aliphatischen Bisguanylethylhydrazone mit 1 g %iger RNS-Lösung.

Steigungskonstanten m ($m = b =$ Regressionskoeffizient), apparente Bindungskonstante k^+ (Abb. 10, Darstellung nach Scholtan, 1962).

n = Anzahl der Versuche, r = Korrelationskoeffizient

	n	a	$b = m$	r	$[k^+ \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{m}]$
BG 2	41	1,3407	0,9012	0,9992	90
BG 4	43	1,3208	0,8770	0,9987	68
BG 7	36	1,1477	0,8923	0,9988	54
BG 17	24	1,1581	0,8861	0,9997	48
BG 32	73	1,0697	0,9055	0,9988	50

aliphatischen Bisquanylhydrazone als statistisch gesichert angesehen werden können. Deshalb wurde eine einfache Varianzanalyse mit angeschlossenen Scheffre-Test durchgeführt. Hierdurch sollte gezeigt werden, zwischen welchen α -Werten signifikante Differenzen bestehen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Varianzanalyse und des Scheffre-Test zusammengestellt. Tabelle 5 zeigt, daß zwischen den Substanzen BG 2 und BG 7 und BG 4 und BG 7 auffällige Differenzen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,01$ und zwischen BG 2 und BG 7 signifikante Unterschiede bestehen bei $P \leq 0,05$. Ein signifikanter Unterschied besteht nicht zwischen den Substanzen BG 7 und BG 17 und zwischen BG 17 und BG 32.

2.b) Abhängigkeit des α -Wertes von der RNS-Konzentration.

Die Untersuchungen mit 0,5 g % und 0,1 g % RNS-Lösungen und 3 mg % BG 32 zeigen im Verlauf der Elutionskurven einen Unterschied zur Gelfiltrationskurve der 1 g % RNS und 3 mg % BG 32-Lösung. Bei der 0,1 und 0,5 g % RNS erreicht die BG-Konzentration im ersten Gipfel nicht den 100 %-Wert der Ausgangslösung, sondern nur 80 % davon. Ein zweites Plateau jedoch ist auch hier ausgebildet (Abb. 11). Um 100 % im ersten Plateau zu erhalten,

Tab. 5

Varianzanalyse und Scheffre-Test für die Wechselwirkung zwischen den aliphatischen Bisguanylhydrazonen (3 mg %) und Ribonukleinsäure (1 g %)

Substanzen, $n = \text{Anzahl der Versuche}$, $\bar{x} = \text{Mittelwert der } \alpha\text{-Werte}$, Mittelwertsdifferenzen, $x \leq 0,05$ signifikante Differenzen, $xx \leq 0,01$ hoch signifikante Differenzen

Substanzen		Mittelwertsdifferenzen				
n	$\bar{x}$	BG 2	BG 4	BG 7	BG 17	BG 32
BG 2	12	10,2				
BG 4	16	12,9				
BG 7	9	16,4				
BG 17	4	17,0				
BG 32	24	17,2				
		0,7 ^x				
		4,2 ^{xx}	3,5 ^{xx}			
		6,8 ^{xx}	4,1 ^{xx}	0,6		
		7,2 ^{xx}	4,3 ^{xx}	0,8 ^x	0,2	

1
35
1

Ursache der Varianz	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungs- quadrate	Mittleres Abweichungsquadrat	F	Signifikanz
Zwischen den Substanzen	4	496,95	124,24	493	$p < 0,01$
Innerhalb der Substanzen	60	15,17	0,25		
Insgesamt	64	512,12			

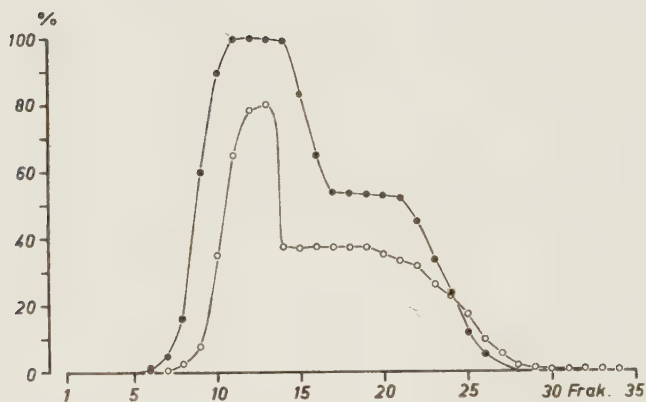


Abb. 11

Elutionskurven der 0,1 g %igen und 3 mg %igen RNS-BG-Lösung bei verschiedenen Auftragsvolumina. o - Kurve mit einem Auftragsvolumen von 20 ml und ● - Kurve mit einem Auftragsvolumen von 40 ml. Durch Verdopplung des Volumens von 20 auf 40 ml steigt das Maximum von 80 % auf 100 % der Ausgangskonzentration im ersten Plateau. Der α -Wert erhöht sich von 37 % auf 54 %. Koordinaten wie in Abb. 2.

versuchten wir es mit kürzeren Säulen. Mit kürzer werden-
der Säule näherte sich das Konzentrationsmaximum im ersten
Plateau der Ausgangskonzentration. Als schließlich bei
einer Säulenlänge von 10 cm eine Übereinstimmung zwischen
der Ausgangskonzentration und der Maximalkonzentration
im ersten Plateau erreicht war, bildete sich kein zwei-
tes Plateau aus, sondern der BG Konzentrationsverlauf
fiel zur Abszisse hin ab, ohne daß sich in wenigstens
drei aufeinanderfolgenden Fraktionen ein gleicher Wert
einstellte. Auch der Versuch mit einem anderen Sephadex-
Gel (Sephadex-G-50) scheiterte. Deshalb trugen wir ein
größeres Ausgangsvolumen, nämlich 40 ml auf und eluier-
ten wie gewöhnlich. Unter diesen Bedingungen erhielten
wir eine Elutionskurve mit 100%igem Maximum im ersten
Plateau und einem deutlichen zweiten Plateau. Bei 20 ml
Auftragslösung war der Maximalwert im ersten Plateau
80 % und der α -Wert 37 %. Bei 40 ml war der Maximal-
wert im ersten Gipfel 100 % und der α -Wert 54 % der
Ausgangskonzentration bei 0,1 g %iger RNS-Konzentration.
Bei 0,5 g % RNS- und 3 mg % BG 32-Lösung bei einer Säulen-
länge von 40 cm und 20 ml Auftragsvolumen war das erste
Maximum 88 % und der α -Wert 24 %. Bei 40 ml Auftrags-
volumen entspricht der Maximalwert des ersten Plateaus
der Konzentration der Auftragslösung und der α -Wert
liegt nun bei 28 % freiem Anteil.

2.c) Abhängigkeit der BG 32-Ribonukleinsäurebindung vom pH-Wert.

Bei Änderung des pH-Wertes bei der Ribonukleinsäurebindung des BG 32 ist nur eine geringe Zunahme des α -Wertes mit sinkendem pH-Wert zu verzeichnen. Bei saurem pH vermag die Ribonukleinsäure weniger BG 32 zu binden als bei pH 8,0. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 12 dargestellt.

2.d) Abhängigkeit des α -Wertes von der NaCl-Konzentration.

Durch Zugabe von NaCl in den Konzentrationen von 0,01 M, 0,05 M, 0,1 und 0,15 M, nimmt der α -Wert linear zu. Bei 0,15 molarer NaCl-Konzentration (0,9 g %) liegt ein α -Wert von 57 % vor. Dieses Verhalten zeigen nicht allein BG 32, sondern auch die anderen untersuchten aliphatischen BGs und zwar haben alle Substanzen bei einer NaCl-Konzentration von 0,15 M einen α -Wert von ca. 57 % der Ausgangskonzentration. Diese Relation ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Gerade, die sich in dieser Beziehung ergibt, hat als Regressionskoeffizienten r einen Wert von 0,9750. Eine Gelfiltration einer 1 g % RNS, 3 mg % BG 32 und 0,15 M NaCl-Lösung ist in Abbildung 14 dargestellt. In diesem Bild zeigt sich im Vergleich zu Abb. 2, daß das Natriumchlorid eine starke

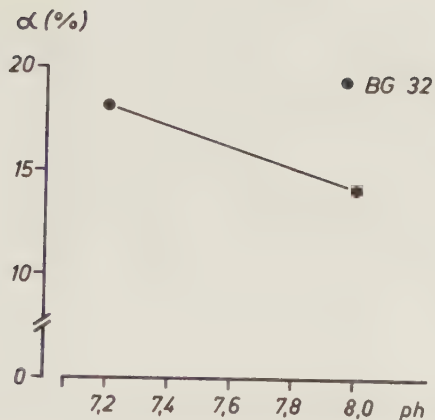


Abb. 12

BG 32-Bindungsvermögen einer 1 g %igen RNS-Lösung.
Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freiem
BG 32 (in Prozent, auf der Ordinate) vom pH-Wert der
Lösung (Abszisse).

Dargestellt ist die Regressionsgerade:

$$y = -3,048x + 19,456 \quad r = 0,8990 \quad n = 24$$

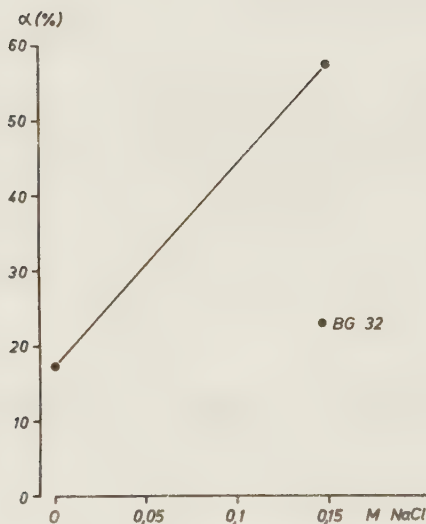


Abb. 13

BG 32-Bindungsvermögen einer 1 g %igen RNS-Lösung.

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freiem BG 32 (in Prozent, auf der Ordinate) von der Natriumchlorid-Konzentration (in M, auf der Abszisse).

Dargestellt ist die Regressionsgerade:

$$y = 1,0824x + 16,8240 \quad r = 0,9480 \quad n = 32$$

n = Anzahl der Versuche

r = Korrelationskoeffizient

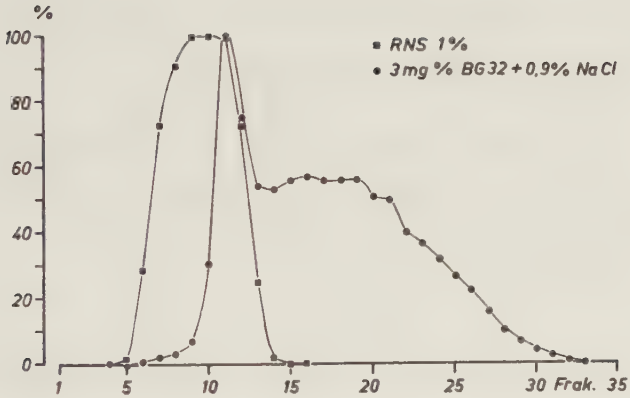


Abb. 14

Beispiel einer Gelfiltration einer 1 g %igen RNS und 3 mg %igen BG 32-Lösung unter Einwirkung von 0,15 molarer NaCl-Konzentration. Koordinaten wie Abb. 2.

Einwirkung auf die Bindungsfestigkeit hat. NaCl verdrängt das BG 32, aber auch die anderen BGs von den Bindungsstellen der Ribonukleinsäure, das besonders im Bereich von Fraktion 5-10 deutlich wird (Abb. 14). Erst allmählich erreicht die BG-Konzentration die 100 % des Ausgangswertes, um dann parallel mit der RNS-Elutionskurve abzufallen und erreicht ein breites zweites Plateau. Das Natriumchlorid verdrängt das BG aus der Bindung mit der RNS.

2.e) Die Einwirkung von Harnstoff auf die BG-RNS-Bindung.

Durch Zugabe von 3 und 6 M Harnstoff zur 1 g % RNS und 3 mg % BG 32-Lösung konnte der freie Anteil von BG 32 erhöht werden. Dabei war der α -Wert bei 3 M Harnstoff 25 % und bei der 6 M 38 %, d.h., daß nicht allein durch NaCl der α -Wert vergrößert werden kann, sondern auch durch die Einwirkung von Harnstoff.

2.f) Abhängigkeit des α -Wertes von der Temperatur.

Die Temperaturabhängigkeit der Ribonukleinsäure ist in Abb. 15 gezeigt. Charakteristisch ist die relativ starke Zunahme des α -Wertes bei dem Temperaturanstieg von 4°C bis 22°C, während nur eine geringe Zunahme des α -Wertes bis 50°C festzustellen ist.

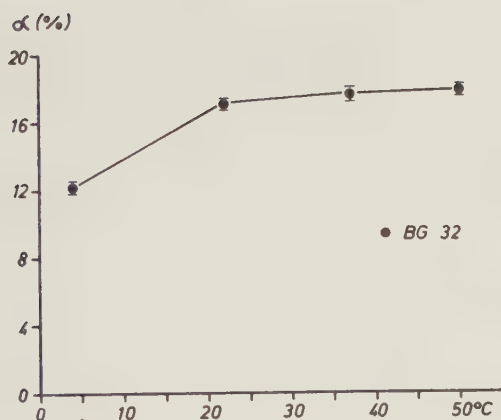


Abb. 15

Abhängigkeit des α -Wertes von BG 32 von der Temperatur. Die α -Werte wurden bei folgenden Temperaturen untersucht.

Abszisse: Temperatur in °Celsius, 4°C, 22°C, 37°C und 50°C.

Ordinate: α -Wert in % der Ausgangskonzentration.

Die eingezeichneten Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ dar.

IV. DISKUSSION

Die verwendete Hefe-RNS mußte für alle Versuche vordialysiert werden, da sie ein Gemisch aus hoch- und niedermolekularen Anteilen darstellt. In Abbildung 1, die eine Elutionskurve einer 1 g %igen nicht vordialysierten RNS-Lösung bei pH 7,40, 22°C, Sephadex-G-25 und einer Säulenlänge von 40 cm zeigt, ist deutlich zu erkennen, daß die verschiedenen Fraktionen durch den Elutionsvorgang getrennt werden. Dabei erscheinen die höhermolekularen RNS-Anteile und RNS-Aggregate in den ersten Fraktionen, während die niedermolekularen Bruchstücke und Nukleotide durch die Eigenschaften der Sephadexsäule in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verzögert werden und deshalb später im Eluat erscheinen. Die Gel-filtration an Sephadex-Säulen ist in den vergangenen Jahren mehrfach zur Fraktionierung von Nukleinsäuren und Nukleinsäurebausteinen herangezogen worden (Flodin, 1962). Bei der Abtrennung der hochmolekularen RNS von niedermolekularen Bruchstücken und der Trennung der RNS von begleitenden Substanzen hat sich Sephadex bewährt, wobei die Größe der Moleküle und/oder die Sekundärstruktur von Bedeutung sein dürften. Mit nicht vordialysierter RNS wäre eine exakte Bestimmung der Bindung der Bis-guanylhidrazone an RNS nicht möglich gewesen, da sich die Elutionskurven der niedermolekularen RNS-Bruchstücke

und der Bisguanylhydrazone (Abb. 1 u. 3) überschneiden. In diesem Bereich wäre eine exakte Aussage über den prozentualen freien Anteil der Bisguanylhydrazone nicht möglich, da auch eine Bindung von BG an die Bruchstücke und Oligonukleotide der RNS möglich ist (Riechert und Wollert, 1971). Durch die Vordialyse gelang es, die niedermolekularen Anteile zu eliminieren (Abb. 1).

In dem untersuchten Bereich von 1,5 mg % bis 12 mg % zeigt die Bindung der untersuchten Substanzen an Ribonukleinsäure nur eine geringe Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Substanzen. Aus Abbildung 4 ist das fast gleichartige Verhalten der Substanzen gegenüber einer Änderung der Konzentration zu erkennen, wobei der α -Wert mit steigender Gesamtkonzentration zunimmt. Große Unterschiede in der Ribonukleinsäurebindung der untersuchten Substanzen wurden nicht festgestellt. Das Bindungsvermögen der RNS-Lösung für aliphatische Bisguanylhydrazone nimmt mit der Kettenlänge der Substanzen ab, d.h., daß der α -Wert des BG 32 größer ist, als der von BG 2. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Eiweißbindung dieser aliphatischen Guanylhydrazone (Hofmann u. Mitarb., 1970). Die Bindung der aliphatischen Guanylhydrazone an Albumin nimmt mit Ausnahme von BG 2 mit der Kettenlänge zu, was von den Autoren mit der Zunahme der hydrophoben Eigenschaften der Substanzen erklärt wird, der

α -Wert dementsprechend ab. Bei der Wechselwirkung mit Ribonukleinsäure hat BG 2 den kleinsten α -Wert, es wird also am stärksten gebunden. Es liegt nur ein geringer Unterschied zwischen den α -Werten von BG 7, BG 17 und BG 32 vor, während der α -Wert von BG 2 sich um einige Prozent von diesen unterscheidet. Dieses Verhalten könnte mit den größeren hydrophilen Eigenschaften des BG 2 und BG 4 erklärt werden, die eine Zunahme der Bindung an das Ribonukleinsäuremolekül bedingt. Dieser Befund bei der RNS-Bindung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Eiweißbindung (Scholtan, 1968). Denn durch Vergrößerung des hydrophoben Charakters verstärkt sich die Eiweißbindung, während sich die Ribonukleinsäurebindung bei einer Zunahme des hydrophilen Charakters verstärkt. Scholtan (1968) konnte aber auch zeigen, daß das Ausmaß der Eiweißbindung nicht allein von dem Verteilungskoeffizienten bestimmt wird, denn Pharmaka mit dem gleichen Verteilungskoeffizienten aber unterschiedlicher Struktur, werden von Albumin unterschiedlich gebunden und haben einen verschiedenen großen α -Wert. Aus dieser Feststellung und der physikalischen und chemischen Unterschiede zwischen Eiweißen und der Ribonukleinsäure muß man schließen, daß verschiedene Einflußgrößen die Bindungen der Substanzen an die RNS oder an Eiweiß bestimmen, wie z.B. ionogene Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen (Scholtan, 1968).

Daß heterologe Bindungskräfte bei der RNS-Bindung von Bedeutung sind, läßt sich aus den Versuchen mit der Zugabe von NaCl in bestimmten Konzentrationen schließen. Das Ionenpaar NaCl, das in der RNS-BG-Trispuffer-Lösung dissoziiert vorliegt, vermag die Bindung von BG 32 zu schwächen und zwar erhöht sich dabei der freie Anteil von 17 % auf 57 % der Ausgangskonzentration bei 0,15 molarer Konzentration von NaCl bei einer 1 g %igen RNS- und 3 mg %iger BG-Lösung (Abb. 14). Frühere Untersuchungen über die Wechselwirkung von Ionen (Metallionen) mit Proteinen (Perkins and Banerjee, 1962; Bryan and Frieden, 1967) zeigen, daß sich die Bindungsstärke unter dem Einfluß der Ionen ändert und zwar dahin, daß der freie Anteil der gebundenen Substanzen zunimmt. Die Zugabe von NaCl bewirkt eine Stabilisierung der RNS-Sekundärstruktur (Cox und Littauer, 1962; Watanabe und Kawade, 1958). Zubay and Doty (1962) deuten in ihrer Arbeit an, daß Metallionen an die Basen der Ribonukleinsäure gebunden sind, während Wiberg und Neumann (1957) als die Bindungsorte die Phosphatgruppen der RNS vermuten. In der Arbeit von Banerjee und Perkins (1962) wurde ermittelt, daß die Metallionen an die Phosphatgruppen der RNS gebunden sind. Daß Ionen die Bindung von Pharmaka an Ribonukleinsäure hemmen, konnte auch Last (1969) zeigen, indem er einer Tetrazyklin-RNS-Lösung Mg^{++} -Ionen in steigender Konzentration zugab und dabei ein Anstieg an

freiem Tetrazyklin feststellte. In der gleichen Richtung sind auch unsere Versuche zu verstehen. Denn auch hier zeigte sich mit gleicher steigender NaCl-Konzentration von 0,01 bis 0,15 molar ein linearer Anstieg des α -Wertes, d.h., NaCl verdrängt das BG von seinen Bindungsstellen der RNS, wobei als Bindungsstelle die Phosphatgruppen der RNS anzunehmen sind und nicht die Bindungsstellen der Basen, wie Zubay und Doty (1962) vermuteten, Banerjee und Perkins konnten die Phosphatgruppen als Ort der Bindung identifizieren und durch Versuche beweisen, daß die Basen in dem in den Versuchen vorliegenden pH-Bereich von 7 bis 8 nicht ionisiert sind, sondern erst im alkalischen Milieu bei pH 9 bis 12 ionisieren. Die Darstellung der Versuchsergebnisse nach Scatchard (1949) ergibt leicht gekrümmte Linien (Abb. 5 u. Abb. 6), was für mindestens zwei Sätze bindender Gruppen mit unterschiedlicher Affinität spricht. Eine Sättigung der Bindungsstellen am RNS-Molekül konnte nicht erreicht werden (Abb. 4). Die Werte von n als Anzahl der Bindungsstellen im Scatchard-Diagramm (Abb. 5 u. Abb. 6) liegen weit höher als 15, wobei die Linien der längerkettigen Bisquanylhydrazone steiler zur Abszisse verlaufen und diese früher schneiden, als die Kurven der kurzkettigen Bisquanylhydrazone.

Bezüglich der Abhängigkeit vom pH-Wert ähneln sich die Wechselwirkungen der Guanylhydrazone mit der RNS bzw. Albumin (Hofmann u. Mitarb., 1970). In beiden Fällen nimmt die Bindung von BG 32 in den untersuchten pH-Bereichen von 7,20 bis 8,0 zu. Bei saurer Lösung bindet die RNS weniger Substanz als bei alkalischer Lösung (Abb. 12).

Die Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit sollten zusätzliche Aufschlüsse über die Natur der RNS-Bindung ergeben. Im Bereich zwischen 4° und 22°C ändert sich der α -Wert wesentlich, während zwischen 22°C und 50°C nur eine geringe Zunahme des α -Wertes vorliegt (Abb. 15). Ob eine Affinitätszunahme der bindenden RNS-Gruppen wie bei Albumin (Scholtan, 1962) für die Bindungszunahme bei geringerer Temperatur in Frage kommt oder sich die Konformation der RNS ändert, kann noch nicht beantwortet werden. Denn noch ist über die Anordnung der Kette im Raum im Fall der RNS wesentlich weniger bekannt als bei der DNS. Bei hochmolekularer RNS ist auch eine Basenpaarung möglich, während bei kurzkettiger RNS sich eine Basenpaarung nur über kurze Strecken ausbilden kann. Strukturmodelle der RNS werden noch diskutiert (Seidel und Cramer, 1965).

Auch besteht die Möglichkeit, daß bei geringerer Temperatur (Cox and Littauer, 1962) eine Zunahme und

Stabilisierung der Sekundärstruktur der RNS für die stärkere Bindung verantwortlich ist.

Die Frage, ob auch hydrophobe Wechselwirkungen bei der RNS-Bindung ähnlich der hydrophoben Wechselwirkungen bei der Eiweißbindung eine Rolle spielen, sollten mit den Versuchen mit Harnstoffzugaben in Konzentrationen von 3 M und 6 M Konzentration näher untersucht werden, denn noch gibt es keinen direkten Beweis für das Vorliegen und die Messung von hydrophoben Wechselwirkungen. Das charakteristische der hydrophoben Bindung ist, daß sie sich zwischen apolaren Gruppen in wäßriger Lösung auswirken und zwar derart, daß sich mehrere apolare Gruppen, durch einen Entropieeffekt begünstigt, assoziieren (Nemethy, 1967). Unter der Einwirkung von Harnstoff konnte der freie Anteil bei 3 molarer auf 25 % und bei 6 molarer Harnstoffkonzentration auf 38 % erhöht werden. Harnstoff muß also die Fähigkeit haben, BG 32 von den Bindungsstellen zu verdrängen oder die Konformation der Ribonukleinsäure derart zu verändern, daß sich der α -Wert erhöht. Welche Veränderungen dabei am Ribonukleinsäuremolekül geschehen, kann nicht beantwortet werden. Es ist zu vermuten, daß sich Harnstoff seiner Fähigkeit entsprechend Wasserstoffbrückenbindungen aufzulösen und hydrophobe Bindungen zu schwächen bei der Ribonukleinsäurebindung der aliphatischen Bisguanyl-

hydrazone verhält. Diese Ergebnisse über die Wechselwirkung von RNS und aliphatischen BGs im Vergleich zu den Ergebnissen von Riechert und Wollert (1971) über die Bindung von aromatischen Bisquanylhydrazonen entsprechen den Verteilungsuntersuchungen von Hofmann und Wollert (1969). In der Untersuchung über die Verweildauer im Organismus konnten sie feststellen, daß BG 31 und BG 60 eine sehr lange Verweildauer haben, während BG 32 schon nach kurzer Zeit verschwunden ist. Daß auch diese Substanzen mit der mikrosomalen RNS in vivo in Wechselwirkung stehen, ist anzunehmen, obwohl für sie nach den Organverteilungsversuchen und Verweildauer in den Organen nur eine kurzzeitige Beziehung vorliegen kann, während für die stärker an die RNS gebundene Substanz BG 60 für die eine spezifische Anreicherung an die Mikrosomenfraktion im Meerschweinchenherzen nachgewiesen wurde und eine Bindung der Substanz an die RNS anzunehmen ist, eine Halbwertszeit für das Verschwinden von BG 60 aus dem Herzen von ungefähr einem Jahr ermittelt wurde.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wechselwirkung von einigen aliphatischen Bisguanylhya-
drazonen und Hefe-RNS wurde mit Hilfe der Sephadex-
gelfiltration untersucht. Als charakteristische Größen
der Wechselwirkung zwischen Ribonukleinsäure und Bis-
guanylhya-
drazonen wurden der prozentuale Anteil α an
freier Substanz, die apparente Bindungskonstante k^+ nach
der Darstellung nach Scholtan (1962) und die Steigungs-
konstante m oder Regressionskoeffizient bestimmt. Die
Größen der Gesamtbindungskonstante K_1 , der freien Reak-
tionsenergie ΔF^0 und der Anzahl der Bindungsstellen
konnte bei den angenommenen Molekulargewichten der RNS
von 100.000 und 500.000 angegeben werden. Die Bindung
der Bisguanylhya-
drazone an Ribonukleinsäure nahm mit
zunehmender Kettenlänge ab. Die untersuchten alipha-
tischen Bisguanylhya-
drazone zeigen nur geringe Unter-
schiede in der Bindungsfestigkeit. Durch Zusätze von
Natriumchlorid und Harnstoff und durch Temperaturerhöhung
konnten die Bisguanylhya-
drazone aus ihrer Bindung an Ri-
bonukleinsäure verdrängt werden.

Aus den erhaltenen Ergebnissen darf man schließen, daß
neben ionogenen Bindungskräften auch hydrophobe Wechsel-
wirkungen bei der Bindung von aliphatischen Bisguanylhya-
drazonen an Ribonukleinsäure von Bedeutung sind.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Banerjee, K.C. and D.J. Perkins:

The interaction of some metal ions with deoxyribonucleic and ribonucleic acids in aqueous solution. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 61, 1-6 (1962)

Bryan, S.E. and E. Frieden:

Interaction of Copper (II) with Deoxyribonucleic Acid below 30° . Biochemistry Vol. 6, No. 9, September 1967

Cox, R.A. and U.Z. Littauer:

Ribonucleic acid from escherichia coli. III. The influence of ionic strength and temperature on hydrodynamic and optical properties. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 61, 197-208 (1962)

Dutta, S., S. Goswami, J.O. Lindower and B.H. Marks:

Subcellular distribution of digoxin- H^3 in isolated guinea-pig and rat hearts. Fed.Proc. 26, 398 (1967)

Ehmer, A., K. Jahr, G. Kuschinsky, H. Lüllmann,

E. Mutschler und U. Wollert:

Über die Herzwirksamkeit einfacher Bisguanylhydrazons. Arzneim.-Forsch. 14, 12 (1964)

Flodin, P:

Dextran gels and their applications in gel filtration. Pharmacia, Uppsala, 1962

Gerber, H.-G., U. Fricke, W. Klaus und U. Wollert:

Über die intracelluläre Verteilung von 3H -Digitoxin im Meerschweinchenherzen. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 260, 119 (1968)

Greeff, K., K. Meng und D. Schwarzmann:

Digitalis-ähnliche Eigenschaften des Prednison-
und Prednisolonbisguanylhydrazons.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmakol.

249, 416 (1964)

Hansch, C., K. Kiehs and G.L. Lawrence:

The role of substituents in the hydrophobic binding
of phenole by serum and mitochondrial proteins.

J.Amer.chem.Soc. 87, 5770-5773 (1965)

Halbach, R., G. Kuschinsky, E. Mutschler und U. Wollert:

Über einen Unterschied in der Art der Herzwirksam-
keit von Mono- und Bisguanylhydrazonen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path.

252, 387 (1965)

Hofmann, P., J. Krieglstein, E. Mutschler und U. Wollert:

Die Bestimmung der Eiweißbindung einiger Guanylhydra-
zone mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration.

Arzneim.-Forsch. 20, 681-684 (1970)

Hofmann, P. und U. Wollert:

Die Verteilung des Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon
und des Dodecandion-2,11-bisguanylhydrazon im Meer-
schweinchenorganismus.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path.

262, 484-494 (1969a)

Hofmann, P. und U. Wollert:

Die Verteilung des herzoglykosidartig wirkenden 3,3'-
Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon im
Meerschweinchenorganismus.

Arzneim.-Forsch. 19, 1845-1849 (1969b)

Hofmann, P. und U. Wollert: Über die subcelluläre Verteilung von 3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenylbis-guanylhydrazon im Meerschweinchenherzen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path.
263, 417-426 (1969c)

Hofmann, P. und U. Wollert:
Eine Methode zum quantitativen Nachweis von Guanylhydrazonen und deren Bestimmung im tierischen Material.
Arzneim.-Forsch. 19, 138-140 (1969d)

I-San Lin, R. and O.A. Schjeide:
Micro estimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction.
Analyt.Biochem. 27, 473-483 (1969)

Krieglstein, J. und G. Kuschinsky:
Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka durch Gelfiltration.
Arzneim.-Forsch. 18, 287-289 (1968)

Krieglstein, J. und G. Kuschinsky:
Über die Wechselwirkung von Phenothiazinderivaten mit Rinderserumalbumin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path.
262, 1-16 (1969)

Kroneberg, G., K.H. Meyer, E. Schraufstätter, S. Schütz und K. Stoepel:
Synthetische Verbindungen mit Digitaliswirkung.
Naturwissenschaften 51, 192-193 (1964)

Kuschinsky, K.:
Über die Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen für Herzglykoside.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path.
262, 388-398 (1969)

Last, J.A.:

Studies on the binding of tetracycline to ribosomes.
Biochim.Biophys.Acta 195, 506-514 (1969)

Lomax, G.D.:

Determination of protein-bound magnesium and calcium
by gel-filtration.
J.med.Lab.Tech. 24, 103-112 (1967)

Lord, E.:

The use of range in place of standard deviation in
the t-test.
Biometrika 34, 41 (1947)

Nemethy, G.:

Hydrophobe Wechselwirkungen.
Angew. Chem. 79, 260-271 (1967)

Nichol, L.W. and D.J. Winzor:

The determination of equilibrium constants from
transport data on rapidly reacting systems of the
type $A + B \rightleftharpoons C$.
J.Phys.Chem. 68, 2455-2463 (1964)

Nichol, L.W. and D.J. Winzor:

Evaluation of gel filtration data on systems
interacting chemically and physically.
Arch.Biochem.Biophys. 121, 517-521 (1967)

Riechert, M. und U. Wollert:

Über die Wechselwirkung herzwirksamer Substanzen
mit Ribonukleinsäure.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak. 268, 140-152 (1971)

Scatchard, G.:

The attractions of proteins for small molecules and
ions.
Ann.N.Y. Acad.Sci. 51, 660-672 (1949)

Seidel, H. und F. Cramer:

Untersuchungen über die Sekundärstruktur von löslicher RNA aus Hefe.

Biochim.Biophys.Acta 108, 367-375 (1965)

Schneider, K.W., W. Gattenlöhner und L. Pippig:

Die Veränderungen haemodynamischer Größen bei kardiovaskulär Dekompensierten und Kreislaufgesunden unter Prednison-Bisguanylhydrazon.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 253, 84 (1966)

Schneider, K.W., L. Pippig und W. Gattenlöhner:

Die Wirkung von Prednison-Bisguanylhydrazon auf die haemodynamischen Parameter im akuten Versuch.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 250, 283 (1965)

Schneider, K.W., L. Pippig und W. Gattenlöhner:

Die Wirkung von Prednison-Bisguanylhydrazon auf die haemodynamischen Parameter im akuten Versuch.

Ärztl.Forsch. 19, 232 (1965)

Scholtan, W.:

Über die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Serumeiweißkörper.

Makromol.Chem. 54, 660-672 (1962)

Scholtan, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

4. Mitteilung: Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Eiweißbindung.

Arzneim.-Forsch. 14, 1139-1146 (1964)

Scholtan, W.:

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonukleinsäure.

Arzneim.-Forsch. 18, 505-517 (1968)

Scholtan, W. und H. Rosenkranz:

Die Bindung von Steroidhormonen und von Steroid-guanylhydrazonen an Serumalbumin.

Arzneim.-Forsch. 18, 767-780 (1968)

Siebert, G.:

Subcelluläre Strukturen und ihre biologische Funktionen.

Molekularbiologie - Bausteine des Lebendigen, Umschau Verlag Frankfurt/M. 1967

Snedecor, G.W.:

Statistical Methods applied to Experiments in Agricultur and Biology.

4. Auf. Ames, Iowa 1948

Watanabe, I. and Y. Kawade:

Abstracts of the IV. International Congress of Biochemistry.

p. 35. Vienna: Pergamon Press 1958

Wollert, U.:

Pharmakologische Eigenschaften von Mono- und Bisguanylhydrazonen.

Arzneim.-Forsch. 19, 680-683 (1969)

Wood, G.C. and P.F. Cooper:

The application of gel filtration to the study of protein-binding of small molecules.

Chromatog.Rev. 12, 88-107 (1970)

Zachau, H.G.:

Oligo- und Polynucleotidtrennungen. IV. Chromatographie von löslicher Ribonucleinsäure und deren Spaltprodukten an Sephadex.

Biochim.Biophys.Acta 108, 355-366 (1965)

Zubay, G. and P. Doty:

Nucleic acid interactions with metal ions and amine acids.

Biochim.Biophys.Acta 29, 47 (1958)

L E B E N S L A U F

Am 19.9.1945 wurde ich, Walter Christian Weinbach, in Westhofen geboren. Nachdem ich fünf Jahre die Volksschule in Westhofen besucht hatte, wechselte ich in das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gauß-Gymnasium Worms über und legte am 2.3.1966 die Reifeprüfung ab.

Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1966, nachdem ich die Ergänzungsprüfung Kleines Latinum abgelegt hatte. Am 30.9.1967 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und beendete am 31.3.1969 mit dem Bestehen des Physikums das vorklinische Studium. Im Wintersemester 1969/70 begann ich an meiner Dissertation im Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.

Im Frühjahr 1972 werde ich das Medizinische Staatsexamen ablegen.

BAMBERGER FOTODRUCK · RUDOLF RODENBUSCH
6600 BAMBERG · Pöldorferstr. 88 Telefon 0951/31299